

## PHOSPHOLIPASE A2 INHIBITOR

Publication number: JP2001220353

Publication date: 2001-08-14

Inventor: MURAKAMI ARIYOSHI; HATANI AKIRA; OKUMURA HIDENOBU; TERAI SHIN

Applicant: NOEVIR KK

Classification:

- international: A61K36/73; A61K36/18; A61K36/48; A61P1/04;  
A61P9/10; A61P11/02; A61P11/06; A61P17/00;  
A61P19/02; A61P29/00; A61P37/08; A61P43/00;  
A61K36/185; A61K36/18; A61P1/00; A61P9/00;  
A61P11/00; A61P17/00; A61P19/00; A61P29/00;  
A61P37/00; A61P43/00; (IPC1-7): A61K35/78;  
A61P1/04; A61P9/10; A61P11/02; A61P11/06;  
A61P17/00; A61P19/02; A61P29/00; A61P37/08;  
A61P43/00

- European:

Application number: JP20000029323 20000207

Priority number(s): JP20000029323 20000207

[Report a data error here](#)

### Abstract of JP2001220353

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a phospholipase A2 inhibitor capable of being easily prepared, having phospholipase A2-effectively inhibiting activity, having only low irritation, not having toxicity and sensitizing potential, suitable for oral administration and/or local administration to the skin, and also excellent in stability. SOLUTION: One or more kinds selected from the group consisting of Rosa multiflora Thunb., its allied species such as Uncaria gambir Roxb., Acacia catechu Willd. and Pentace burmanica Kunz., and Sanguisorba officinalis L. are formulated with various carriers or bases.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19)日本特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-220353

(P2001-220353A)

(43)公開日 平成13年8月14日(2001.8.14)

(51)Int.Cl.  
A 6 1 K 35/78

識別記号

F I  
A 6 1 K 35/78マーク\*(参考)  
H 4 C 0 8 8  
C  
JA 6 1 P 1/04  
9/10A 6 1 P 1/04  
9/10

審査請求 未請求 請求項の数 1 O.L. (全 7 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000-29323(P2000-29323)

(71)出願人 00013:324

株式会社ノエビア  
兵庫県神戸市中央区浜島中町6丁目13番地  
の1

(22)出願日 平成12年2月7日(2000.2.7)

(72)発明者 村上 有美

滋賀県八日市市岡田町宇野上112-1 株  
式会社ノエビア滋賀中央研究所内特許法第30条第1項適用申請有り 1999年11月10日 日  
本化粧品技術者会発行の「第45回 S C C J 研究討論会  
講演要旨集」に発表

(73)発明者 斎谷 彰

滋賀県八日市市岡田町宇野上112-1 株  
式会社ノエビア滋賀中央研究所内

(74)代理人 390000918

竹井 増美

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ホスフォリバーゼA<sub>2</sub>阻害剤

(57)【要約】

【課題】 容易に調製できて有効なホスフォ  
リバーゼA<sub>2</sub>阻害活性を有し、低刺激性で毒性及び感作  
性がなく経口投与や皮膚への局所投与に適し、安定性に  
も優れるホスフォリバーゼA<sub>2</sub>阻害剤を得る。【解決手段】 ノイバラ (*Rosa multiflora* Thun  
b.) 及びその近縁植物、*Uncaria gambir* Roxb.、*Acacia*  
*catechu* Willd.、*Pentace burmanica* Kunz.、及びワレ  
モコウ (*Sanguisorba officinalis* L.) より選択した1  
種又は2種以上の植物の抽出物を、各種担体又は基剤に  
含有させる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】ノイバラ (*Rosa multiflora* Thunb.) 及びその近縁植物、*Uncaria gambir* Roxb.、*Acacia catechu* Willd.、*Pentace burmanica* Kunz.、及びフレモコウ (*Sanguisorba officinalis* L.) より選択した1種又は2種以上の植物の抽出物を含有して成るホスフォリバーゼA<sub>2</sub>阻害剤。

## 【発明の詳細な説明】

【00001】

【発明の属する技術分野】本発明は、アラキドン酸由来のエイコサノイド、リゾリン脂質由來の血小板活性化因子、リゾホスファチジン酸等、刺激に応じた生理活性脂質の産生において律速酵素となるホスフォリバーゼA<sub>2</sub>の活性を有効に抑制することができ、種々の炎症性疾患の治療に有用で、安定且つ安全なホスフォリバーゼA<sub>2</sub>阻害剤に関する。

【00002】

【従来の技術】ホスフォリバーゼA<sub>2</sub>は、生体膜の主要構成成分であるグリセロリン脂質のsn-2位のエステル結合を加水分解し、リゾリン脂質と脂肪酸を遊離する酵素群の総称であり、アラキドン酸由來のエイコサノイド、リゾリン脂質由來の血小板活性化因子やリゾホスファチジン酸など、刺激に応じた生理活性脂質の産生において律速酵素として作用する。

【00003】すなわち、ホスフォリバーゼA<sub>2</sub>によりリゾリン脂質より遊離したアラキドン酸から、脂肪酸シクロオキシゲナーゼによる酸素添加を経て種々のプロスタグランドィン及びトロンボキサンサンthatが生成し、アラキドン酸5-リポキシゲナーゼの酸素添加を経てロイコトリエンが生成される。これらアラキドン酸由來のエイコサノイドは、炎症反応のケミカルメディエーターとして作用する。アスピリンやインドメタシン等の非ステロイド性抗炎症剤は、かかるケミカルメディエーターの生成を抑制するべく、脂肪酸シクロオキシゲナーゼ活性を阻害するものである。

【00004】一方、リゾリン脂質由來する血小板活性化因子は、血小板凝集の他、白血球の遊走、活性化、血管透過性の亢進、血管管、回腸などの平滑筋収縮といった生理活性を有し、さらにホスホリバーゼCを活性化してイノシトール1,4,5-トリリン酸産生を促進し、細胞内カルシウム濃度の上昇やアラキドン酸遊離を惹起するため、やはり炎症反応において重要な役割を演じている。血小板活性化因子の拮抗剤としては、C V 398S、C V 6209、T C V 309、カズレノン等の血小板活性化因子受容体アンタゴニストや、W E B 2086、Y-24180、E-6123等のトリアゾロピペジン系拮抗剤が臨床的に用いられている。

【00005】上記したような生理活性脂質生成の律速酵素であるホスフォリバーゼA<sub>2</sub>の阻害剤としては、細胞質ホスフォリバーゼA<sub>2</sub>に対してはアラキドン酸誘導体

であるアラキドノイルトリフルオロメチルケトンが、分沁型ホスフォリバーゼA<sub>2</sub>に対しては活性中心であるヒスチジン修飾剤であるパラブロモフェナシルブロミドが知られており、さらに臨床上これらによる種々の炎症反応を幅広く抑制しようとする試みとしては、ヒトリボコルチンボリペチド（特開平7-89996）、フコイダン等のヘパリン由來のものを除く硫酸化糖（特開平8-92103）、安息香酸誘導体（特開平8-325154）、多硫酸化ヒアルロン酸、多硫酸化デルマタン硫酸及びこれらの塩（特開平11-269077）などが開示されている。

【00006】しかしながら、上記のようなリピペチドや糖類には、感作性を示すため臨床応用に際し制限を受けるものもあり、一定の品質を保持するために注意を要するものが多い。また他の阻害剤についても、調製や入手が困難であったり、毒性、刺激性等により経口投与に向かない、使用量の制限があるといった問題のあるもののが存在しており、ホスフォリバーゼA<sub>2</sub>阻害活性、安定性及び安全性のすべてを満足するものは少ないのが実情である。

【00007】

【発明が解決しようとする課題】そこで本発明においては、容易に調製できて有効なホスフォリバーゼA<sub>2</sub>阻害活性を有し、低刺激性で毒性及び感作性がなく、経口投与や皮膚への局所投与に適し、安定性にも優れるホスフォリバーゼA<sub>2</sub>阻害剤を得ることを目的とした。

【00008】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決すべく、ホスフォリバーゼA<sub>2</sub>阻害活性を指標にスクリーニングを行ったところ、ノイバラ (*Rosa multiflora* Thunb.) 及びその近縁植物、*Uncaria gambir* Roxb.、*Acacia catechu* Willd.、*Pentace burmanica* Kunz.、及びフレモコウ (*Sanguisorba officinalis* L.) の各植物の抽出物において高い阻害活性を見だした。これら抽出物はいずれも低刺激性であり、毒性及び感作性においても全く問題なく、各種担体に含有させた際の安定性及び経時的な保存安定性についても問題がないことを確認して、本発明を完成するに至った。

【00009】すなわち本発明に係るホスフォリバーゼA<sub>2</sub>阻害剤は、ノイバラ (*Rosa multiflora* Thunb.) 及びその近縁植物、*Uncaria gambir* Roxb.、*Acacia catechu* Willd.、*Pentace burmanica* Kunz.、及びフレモコウ (*Sanguisorba officinalis* L.) より選択した1種又は2種以上の植物の抽出物を、各種担体に含有させて成る。

【00010】

【発明の実施の形態】本発明において用いるノイバラ (*Rosa multiflora* Thunb.) は、わが国に自生するバラ科 (Rosaceae) の蔓性落葉低木であり、生葉「エイジソ」 (*Rosae Fructus*) の基原植物である。この近縁植

物としては、テリハノイバラ (*Rosa wichuriana* Crepi n var. *ampullicarpa* Honda)、フジイバラ (*Rosa fuji sanensis* Makino) が挙げられる。これらの葉、花、幹、枝、果実等各部位を用いることができるが、果実又は偽果を用いるのが特に好ましい。

【0011】本発明において用いる *Uncaria gambir* Rox b. は、インド及び東南アジアに自生するアカネ科 (Rubiaceae) の愛性低木で、生薬「アセンヤク」(Gambir) の基原植物である。また *Acacia catechu* Willd. 及び *Pithecellobium dulce* Kunz. はいずれもアセンヤクの同属生薬である「ペグアセンヤク」の基原植物であり、それぞれマメ科 (Leguminosae) 及びシナノキ科 (Tiliaceae) に属する。本発明においてはこれらの葉、枝、幹、樹皮、花等の各部位を用いることができるが、葉、枝及び樹皮が特に好ましく用いられる。

【0012】本発明において用いるワレモコウ (*Sanguisorba officinalis* L.) は、わが国各地において自生するバラ科 (Rosaceae) の多年生草本で、生薬「チュ」の基原植物として用いられる。葉、花、茎、根茎等の各部位を用いることができるが、特に根部を用いることが好ましい。

【0013】本発明においては、上記植物は生のまま抽出に供してもよいが、抽出効率を考えると、細切、乾燥、粉碎等の処理を行った後に抽出を行うことが好ましい。抽出は、抽出溶媒に浸漬して行う。抽出効率を上げるために攪拌を行ったり、抽出溶媒中にホモジナイズしてもよい。抽出温度としては、5°C程度から抽出溶媒の沸点以下の温度とするのが適切である。抽出時間は抽出溶媒の種類や抽出温度によっても異なるが、4時間～14時間程度とするのが適切である。

【0014】抽出溶媒としては、水の他、メタノール、エタノール、プロパンノール、イソブロパノール等の低級アルコール、1,3-ブチレンジコール、プロピレンジコール、ジアセチレンジコール、クリセリン等の多価アルコール、エチルエーテル、ブロピルエーテル等のエーテル類、酢酸エチル、酢酸ブチル等のエステル類、アセトン、エチルメチルケトン等のケトン類などの極性有機溶媒を用いることができ、これらより1種又は2種以上を選択して用いる。また、生理食塩水、リン酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水等を用いてもよい。

【0015】ノイバラ等上記植物の上記溶媒による抽出物は、そのままで本発明に係るホスフォリバーゼ A<sub>2</sub>阻害剤として用いることができるが、濃縮、乾固したものを水や極性溶媒に再度溶解したり、或いはホスフォリバーゼ A<sub>2</sub>阻害作用を損なわない範囲で脱色、脱臭、脱垢等の精製処理を行ったり、カラムクロマトグラフィーによる分画処理を行った後に用いてもよい。また保存のため、精製処理の後凍結乾燥し、用時に溶媒に溶解して用いることもできる。本発明においては、ノイバラ等上記植物の上記溶媒による抽出物又は前記処理物をそのまま

ま、或いは水、低級アルコール等の水性拘体、乳剤、ゲル、クリーム、軟膏等の基剤に含有させたり、粉末化或いは顆粒化してホスフォリバーゼ A<sub>2</sub>阻害剤とする。また、リボソーム等のベシクルやマイクロカーセル等に内包させることもできる。

【0016】従って、本発明に係るホスフォリバーゼ A<sub>2</sub>阻害剤は、必要に応じてデンプン、乳糖、微結晶セルロース、メタケイ酸アルミニウムマグネシウム等の賦形剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑潤剤、ゼラチン、セラック、ポリビニルピロドリン、メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース等の結合剤、カルボキシメチルセルロースカルシウム等の崩壊剤、ソルビトール、グリセリン等の保湿剤、ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール、トコフェロール等の抗酸化剤、吸収促進剤、界面活性剤、等強化剤等とともに公知の方法によって、軟カプセル剤、硬カプセル剤、錠剤、丸剤、顆粒剤、散剤、懸濁剤、液剤、シロップ剤、乳剤、エリキシル剤等の経口剤、注射剤、坐剤、ペッサリー又は外用剤として提供され得る。

【0017】本発明に係るホスフォリバーゼ A<sub>2</sub>阻害剤は、低刺激性で毒性及び感作性を示さないために、特に経口的に服用したり、又は皮膚において局所的に外用するのに適しており、慢性関節リウマチ、変形性関節症、肩関節周囲炎といった種々の炎症性疾患や、アレルギー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、気管支喘息等のアレルギー性疾患、潰瘍、心筋梗塞、脳梗塞等の虚血性血管障害などの予防又は治療に有効である。

#### 【0018】

【実施例】さらに本発明の特徴について、実施例により詳細に説明する。

【0019】【実施例1】ノイバラ (*Rosa multiflora* Thunb.) の果実 25.0 g を乾燥、粉碎し、5.0 容量% エタノール水溶液 1 リットルに浸漬し、2.5°C で 5 日間静置して抽出を行った。抽出液をろ過してろ液を回収し、水性製剤である実施例1を得た。

【0020】【実施例2】上記の実施例1を、スチレン・ジビニルベンゼン共重合体樹脂カラムである DAI A ION H P 2カラムにかけ、6.0 容量%メタノールにより溶出される画分を回収し、溶媒を留去した後凍結乾燥し、粉末剤である実施例2を得た。

【0021】【実施例3】ノイバラ (*Rosa multiflora* Thunb.) の果実 25.0 g を乾燥、粉碎し、生理食塩水 1 リットル中にて 15°C でホモジナイズした。遠心分離して上清を回収し、これをろ過した後、ろ液 1.00 m l に大豆レシチン 8.0 g を添加して 6.5°C で懸濁し、次いで超音波処理してリボソームを調製し、遠心分離により回収して、実施例3を得た。

【0022】【実施例4】テリハノイバラ (*Rosa wichuriana* Crepin var. *ampullicarpa* Honda) の果実 30.0 g を乾燥、粉碎し、1.3-ブチレンジコール 1.2 リ

ットル中にて20°Cで24時間攪拌抽出した。抽出液をろ過してろ液を回収し、その2.0gを下記に示す処方により調製したゲル基剤9.0gに添加。混合して、

## [ゲル基剤]

(1) ジプロビレングリコール	10.0 (重量%)
(2) カルボキシビニルポリマー	0.5
(3) 水酸化カリウム	0.1
(4) バラオキシ安息香酸メチル	0.1
(5) 精製水	89.3

製法：(5)に(2)を均一に溶解した後、(1)に(4)を溶解して添加し、次いで(3)を加えて増粘させる。

【0024】〔実施例5〕Uncaria gambir Roxb.の葉3.00gを細切し、1.2-ペンタンジオール1.2リットルに没漬し、25°Cで7日間抽出した。抽出液をろ別回収し、1/5容量まで濃縮して、水性製剤である実施例5

## [クリーム基剤]

(1) ミツロウ	6.0 (重量%)
(2) セタノール	5.0
(3) 還元ラノリン	8.0
(4) スクワラン	27.5
(5) グリセリル脂肪酸エステル	4.0
(6) 親油型グリセリルモノステアリン酸エステル	2.0
(7) ポリオキシエチレン(20E.0)ソルビタンモノラウリン酸エステル	5.0
(8) プロビレングリコール	5.0
(9) バラオキシ安息香酸メチル	0.1
(10) 精製水	37.4

製法：(1)～(7)の油相成分を混合、溶解して75°Cとする。一方、(8)～(10)の水相成分を混合、溶解して75°Cに加熱する。次いで、この水相成分に前記油相成分を添加して予偏乳化した後ホモミキサーにて均一に乳化し、冷却する。

【0027】〔実施例7〕フレモコウ(Sanguisorba officinalis L.)の根茎25.0gを乾燥、粉碎し、エタノール1リットル中にて15°Cで24時間攪拌抽出した。

## [水中油型乳剤性軟膏基剤]

(1) 白色ワセリン	25.0 (重量%)
(2) ステアリルアルコール	25.0
(3) グリセリン	12.0
(4) ラウリル硫酸ナトリウム	1.0
(5) バラオキシ安息香酸メチル	0.1
(6) 精製水	36.9

製法：(1)～(4)の油相成分を混合、加熱して均一に溶解し、75°Cとする。一方、(5)、(6)の水相成分を混合、加熱して均一とし、75°Cとする。この水相成分に前記油相成分を搅拌しながら徐々に添加して乳化し、冷却する。

【0030】〔実施例9〕ノイバラ(Rosa multiflora Thunb.)の果実25.0gを乾燥、粉碎し、熱水1.0リットル中にて4時間抽出した。抽出液を濃縮、乾固した後

実施例4を得た。

## 【0023】

(1) ジプロビレングリコール	10.0 (重量%)
(2) カルボキシビニルポリマー	0.5
(3) 水酸化カリウム	0.1
(4) バラオキシ安息香酸メチル	0.1
(5) 精製水	89.3

を得た。

【0025】〔実施例6〕上記実施例5の1.0gを、下記に示す処方により調製したクリーム基剤9.0gに添加、混合し、実施例6とした。

## 【0026】

(1) ミツロウ	6.0 (重量%)
(2) セタノール	5.0
(3) 還元ラノリン	8.0
(4) スクワラン	27.5
(5) グリセリル脂肪酸エステル	4.0
(6) 親油型グリセリルモノステアリン酸エステル	2.0
(7) ポリオキシエチレン(20E.0)ソルビタンモノラウリン酸エステル	5.0
(8) プロビレングリコール	5.0
(9) バラオキシ安息香酸メチル	0.1
(10) 精製水	37.4

抽出液をろ別回収し、次いで減圧濃縮して乾固し、乾固体を20容量%エタノール水溶液100mlに溶解して、水性製剤である実施例7を得た。

【0028】〔実施例8〕上記実施例7の1.0gを、下記に示す処方により調製した水中油型乳剤性軟膏基剤9.0gに添加、混合して実施例8を得た。

## 【0029】

(1) 白色ワセリン	25.0 (重量%)
(2) ステアリルアルコール	25.0
(3) グリセリン	12.0
(4) ラウリル硫酸ナトリウム	1.0
(5) バラオキシ安息香酸メチル	0.1
(6) 精製水	36.9

結乾燥した。前記乾燥粉末0.2g、乳糖5.2.0g、コーンスター22.8g、カルボキシメチルセルロースカルシウム5.0g、セルロース2.0.0gを混合し、顆粒化した後打綿して、一袋0.2gの錠剤を得て実施例9とした。

【0031】〔実施例10〕Uncaria gambir Roxb.の葉及び枝計300gを乾燥、粉碎し、熱水1.0リットル中にて5時間抽出した。抽出液をろ別回収し、濃縮、乾

固した後凍結乾燥した。グリセリン 1.00 g、ボリオキシエチレン硬化ヒマシ油 1.00 g を精製水 4.7.93 g に溶解し、これに前記乾燥粉末 0.50 g、l-メントール 0.50 g をエタノール 40.00 g に溶解して添加した後、サッカリンナトリウム 0.05 g、グルコン酸クロルヘキシジン 0.02 g を順次添加して溶解し、口中清涼剤である実施例 10を得た。

【0032】[実施例 11] ワレモコウ (*Sanguisorba officinalis* L.) の根茎 2.50 g を乾燥、粉碎し、熱水 7.50 m l 中に 4 時間抽出した。抽出液をろ過回収した後殺菌し、前記抽出液 2.00 m l に単槽式 1.00 m l を加え、次いで精製水を加えて 5.00 m l とし、シロップ剤である実施例 11を得た。

【0033】上記本発明の実施例のうち、実施例 1、実施例 2、実施例 5 及び実施例 7 についてホスフォリバーゼ A<sub>2</sub>に対する阻害活性を評価した。阻害活性の評価は、2 mM のアラキドニルチオホスファチルコリンを含む試験液 (4 mM トリpton-100. 30 (w/v)% グリセリン、1.50 mM 塩化ナトリウム、1.0 mM 塩化カルシウム、0.1 (w/v)% ウシ血清アルブミンを含有する) 8.0 mM 2-(4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ビペラジル) エタンスルホン酸 (Hepes) 緩衝液 (pH 7.4) ) 9.0 μl に、試料をそれぞれ最終濃度が 0.5 (w/v)% となるように添加し、1 mg/m l の細胞ホスフォリバーゼ A<sub>2</sub>を添加し、37°C で 1 時間静置した後、2.5 mM のジオビス(ニトロ安息香酸) 1.0 μl 及び 4.7.5 mM のエチレンジアミン四酢酸 1.0 μl を添加し、3 分後に 4.05 nm における吸光度 (A<sub>450</sub>) を測定し、試料を添加しない対照における吸光度 (A<sub>0</sub>)との比較により行った。細胞質ホスフォリバーゼ A<sub>2</sub>に対する阻害活性は、(A<sub>0</sub>-A<sub>450</sub>)/A<sub>0</sub> × 1.00 により求めた阻害率 (%) により、表 1 に示した。

	V <sub>max</sub>	K <sub>m</sub>	1/V <sub>max</sub>	K <sub>m</sub> /V <sub>max</sub>
実施例 1 無添加時	0.119	0.460	8.39	3.88
実施例 1 添加時	0.0855	0.603	11.69	7.05

【0038】従って、1/v を 1/[S]<sub>0</sub> に対してプロットした場合、実施例 1 無添加時は 1/v = 3.86 × 1/[S]<sub>0</sub> + 8.39、実施例 1 添加時は 1/v = 7.05 × 1/[S]<sub>0</sub> + 11.69 となり、1/[S]<sub>0</sub> 切片である -1/K<sub>m</sub> はそれぞれ -2.17、-1.66 となって、実施例 1 無添加時の直線と添加時の直線は 1/[S]<sub>0</sub> 軸上及び 1/v 軸上のいずれにおいても交差しないため、実施例 1 による阻害は拮抗型阻害と非拮抗型阻害の混合型であると推察された。

【0039】次に本発明の実施例について、臨床試験によりホスフォリバーゼ A<sub>2</sub> 阻害に基づく効果を評価した。まず、本発明の実施例 3、実施例 4、実施例 6 及び実施例 8 について、皮膚炎患者による臨床試験を行った。その際、実施例 3 においてノイバラ果実の生理食塩

## 【0034】

【表 1】

試 料	ホスフォリバーゼ A <sub>2</sub> 阻害率 (%)
実施例 1	58.0
実施例 2	84.2
実施例 5	51.5
実施例 7	52.3

【0035】表 1 より明らかのように、本発明の実施例 1、実施例 2、実施例 5 及び実施例 7 はすべて 50% 以上の阻害率を示しており、特に実施例 2 では、ほぼ 84% と高い阻害活性が認められていた。

【0036】続いて、本発明のホスフォリバーゼ A<sub>2</sub> 阻害剤の酵素阻害作用について、実施例 1 を用い、ミカエリス・メンテンの速度式による速度論的解析を行った。基質であるアラキドニルチオホスファチルコリンの初期濃度を 0.75 mM 及び 1.50 mM とし、それぞれについて実施例 1 を添加しない系と添加した系で酵素反応を行わせ、上記の酵素活性測定法に従って経時に反応生成物であるオニトロ安息香酸イオンの定量を行った。それぞれの系において初速度 V<sub>0</sub> を算出し、次いで基質の初期濃度 [S]<sub>0</sub> についてプロットして、実施例 1 無添加時及び添加時について近似曲線 (V<sub>0</sub> = -0.0481 ([S]<sub>0</sub>)<sup>2</sup> + 0.1516 [S]<sub>0</sub>、V<sub>0</sub> = -0.01515 ([S]<sub>0</sub>)<sup>2</sup> + 0.0803 [S]<sub>0</sub>) を得た。なお便宜上、反応生成物濃度として 4.05 nm における吸光度を用いて計算を行っている。予備実験より最大速度 V<sub>max</sub> を求め、前記近似式からミカエリス定数 K<sub>m</sub> を算出した。得られた V<sub>max</sub>、K<sub>m</sub>、1/V<sub>max</sub> 及び K<sub>m</sub>/V<sub>max</sub> 値を表 2 に示した。

## 【0037】

【表 2】

水抽出物の替わりに生理食塩水を用いて調製したリポソームを比較例 1 とし、実施例 4、実施例 6 及び実施例 8 において、テリハノイバラ果実、*Uncaria gambir* Roxb. の葉、ワレモコウ根茎の各抽出物を添加しない基剤のみを用いたものをそれぞれ比較例 2～比較例 4 として、同時に試験に供した。臨床試験は、接触皮膚炎患者及びアトピー性皮膚炎患者計 50 名を 1 群とし、各群に実施例及び比較例のそれぞれをブランディングにて 1 日 2 回、3 日間患部に塗布させ、紅斑及び搔痒感の改善状況を調査して行った。紅斑及び搔痒感の改善状況は、「改善」、「やや改善」、「変化なし」、「悪化」の四段階で評価し、各評価を得た患者数にて表 3 に示した。なお、実施例 3 及び比較例 1 については、これらリポソーム 1.0 g を下記に示すローション基剤 9.0 g に添加して使用させ

た。

## 【0040】

## [ローション基剤]

(1) グリセリン	2. 0 (重量%)
(2) 1,3-ブチレンジコール	3. 0
(3) ポリオキシエチレン(25E.O.)オレイルエーテル	0. 2
(4) エタノール	10. 0
(5) バラオキシ安息香酸メチル	0. 1
(6) 香料	0. 1
(7) 精製水	84. 6

製法：(5), (6)を(4)に溶解し、(1)～(3)とともに(7)に添加して均一に混合、溶解する。

## 【0041】

## 【表3】

試験群	紅斑			搔痒感				
	改善	やや改善	変化なし	悪化	改善	やや改善	変化なし	悪化
実施例3	0	32	0	0	5	33	12	0
実施例4	5	34	11	0	5	30	15	0
実施例5	7	33	10	0	6	33	11	0
実施例6	11	32	7	0	8	33	0	0
比較例1	0	4	39	7	0	2	42	5
比較例2	0	5	40	5	0	2	41	/
比較例3	0	7	40	3	0	4	41	5
比較例4	0	5	37	8	0	1	40	9

【0042】表3より明らかなように、本発明の実施例服用群では、いずれにおいても紅斑及び搔痒感について症状の悪化した患者は存在せず、紅斑については7.8%～8.6%、搔痒感については7.0%～8.2%のパネラーで症状の改善傾向が認められており、さらにそれぞれ5名以上の患者において明確な改善を認めていた。これに対し比較例服用群では、症状の改善傾向を認めたのは紅斑について4～7名、搔痒感については1～4名にとどまり、紅斑については3名～8名、搔痒感については9名～9名の患者で症状の悪化が見られていた。すなわち、本発明に係るホスフォリバーゼA<sub>2</sub>阻害剤は外用により、アレルギー性反応を含む炎症反応を有意に抑制することが示された。

【0043】また、本発明の上記実施例3、実施例4、実施例6及び実施例8については、男性30名を用いた24時間の背部閉塞貼付試験において、何ら皮膚刺激性反応を認めず、さらに皮膚感作性反応も認められなかつた。

【0044】次に、実施例9～実施例11について臨床試験を行った。これらにおいても、ノイバラ等の各植物抽出物を精製水に代替して調製したものを比較例5～比較例7とし、同時に評価を行った。臨床試験は、気管支喘息患者50名を1群とし、各群に実施例及び比較例をそれぞれブラインドにて1日2回、3日間内服させ、喘息症状の改善状況を評価して行った。喘息症状の改善状況は上記と同様に「改善」、「やや改善」、「変化なし」、「悪化」として評価し、各評価を得た患者数について表4に示した。

【0045】

【表4】

試験群	改善	やや改善	変化なし	悪化
実施例9	10	35	5	0
実施例10	7	35	8	0
実施例11	6	33	11	0
比較例5	0	1	40	9
比較例6	0	2	38	17
比較例7	0	1	38	11

【0046】表4より明らかなように、本発明の実施例服用群では症状の悪化した患者は見られず、7.8%以上の患者において改善傾向を認めていた。また、6名以上の患者において明確な改善を認めていた。これに対し比較例服用群では、いずれにおいてもほとんどの患者で症状の改善傾向を認めず、9名～12名の患者において症状の悪化を認めていた。すなわち、本発明に係るホスフォリバーゼA<sub>2</sub>阻害剤は、経口的に適用しても有効で、気管支平滑筋の収縮等をも有効に抑制することができる。

【0047】なお、実施例9～実施例11については、臨床試験に先立った経口毒性試験及び催奇形性試験において、急性毒性、亜急性毒性、慢性毒性及び催奇形性は全く認められていなかった。

【0048】さらに、本発明の実施例1～実施例11については、25°Cで6ヶ月間保存した場合において、何ら状態の変化は認められず、またホスフォリバーゼA<sub>2</sub>阻害活性の低下も認められなかった。

【0049】

【発明の効果】以上詳述したように本発明により、有効なホスフォリバーゼA<sub>2</sub>阻害活性を有し、低刺激性で毒性及び感作性がなく経口投与や皮膚への局所投与に適し、安定性にも優れ、さらに調製も容易なホスフォリバーゼA<sub>2</sub>阻害剤を得ることができた。

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	(参考)
A 6 1 P 11/02		A 6 1 P 11/02	
11/06		11/06	
17/00		17/00	
19/02		19/02	
29/00	1 0 1	29/00	1 0 1
37/08		37/08	
43/00	1 1 1	43/00	1 1 1
(72)発明者	奥村 秀信 滋賀県八日市市岡田町宇野上112-1 株 式会社ノエビア滋賀中央研究所内	F ターム(参考) 4C088 AB12 AB51 AB59 AC03 AC04 AC05 AC06 AC11 BA08 BA37 CA03 CA11 NA03 NA06 NA07 NA14 ZA36 ZA59 ZA68 ZA89 ZA96 ZB13 ZB15	
(72)発明者	寺井 健 滋賀県八日市市岡田町宇野上112-1 株 式会社ノエビア滋賀中央研究所内		